

Aus der Klinik für Anaesthesiologie
Klinikum der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Bernhard Zwißler

Purinerge Regulation der T-Zell-Aktivierung

Kumulative Habilitationsschrift

vorgelegt von
Dr. med. Tobias Wöhrle
(2021)

Inhaltsverzeichnis

1. Bedeutung der Arbeit für das Fachgebiet	- 3 -
2. Hintergrund	- 4 -
2.1. Purinerge Metaboliten und purinerger Signaling	- 4 -
2.2. Purinerge Rezeptoren und extrazellulärer ATP-Metabolismus	- 5 -
2.3. Rolle des purinerger Signaling bei Granulozyten	- 6 -
3. Fragestellung	- 7 -
3.1. Exprimieren T-Zellen aktivierende Komponenten des purinerger Signaling?	- 7 -
3.2. Beeinflusst das purinerge System die T-Zell-Aktivierung?	- 8 -
3.3. Besitzt das purinerge Signaling klinische Relevanz und therapeutisches Potential?	- 8 -
4. Ergebnisse	- 8 -
4.1. Expression des purinerger Systems in T-Zellen	- 8 -
4.2. Funktion des purinerger Systems in T-Zellen	- 10 -
4.2.1. Ca^{2+} Signaling	- 11 -
4.2.2. NFAT-Aktivierung	- 12 -
4.2.3. Interleukin-2 Genexpression	- 12 -
4.2.4. Rezeptordistribution zur Immunsynapse	- 14 -
4.2.5. Translokalisierung von Pannexin-1 zur Immunsynapse	- 16 -
4.2.6. Einfluss auf die Mitochondrienaktivität	- 18 -
4.3. Klinische Relevanz und therapeutische Modulation des purinerger Signaling	- 19 -
4.3.1. Hyperosmolare NaCl-Lösung zur Immunmodulation	- 19 -
4.3.2. Expression von P2X7 auf T-Zellen bei neuropathischem Schmerz	- 20 -
4.3.3. Purinerger Signaling in leukämischen T-Zellen	- 20 -
5. Zusammenfassung	- 22 -
6. Literatur	- 24 -
7. Publikationen der kumulativen Habilitationsschrift	- 28 -

1. Bedeutung der Arbeit für das Fachgebiet

Eine wesentliche Herausforderung auf dem Gebiet der Anaesthesiologie und Intensivmedizin stellt das Krankheitsbild der Sepsis dar, eine der schwersten infektiologischen Komplikationen und ein zentrales intensivmedizinisches Problem, sowie eine der häufigsten und kostenintensivsten Erkrankungen. Weltweit stellt die Sepsis mit Mortalitätsraten zwischen 20 und 40% einen der führenden Gründe für das Versterben dar [1, 43]. Das Bild der Sepsis ist durch eine initiale zytokinvermittelte Hyperinflammation gekennzeichnet, welche zu systemischer Entzündung und zu Multiorganversagen führt [25]. Eine Vielzahl klinischer Studien, deren Behandlungsstrategien sich vornehmlich auf die Blockade dieser proinflammatorischen Zytokine fokussierten, erbrachten enttäuschende Ergebnisse [1, 62]. Die initiale hyperinflammatorische Antwort wird jedoch von einer protrahierten immunsuppressiven Phase gegenreguliert (Abb. 1). Dies kann lethale Konsequenzen haben, da das zelluläre Immunsystem außer Kraft gesetzt wird, welches dem Patienten normalerweise erlaubt, die Infektionen zu bekämpfen [25, 26, 28].

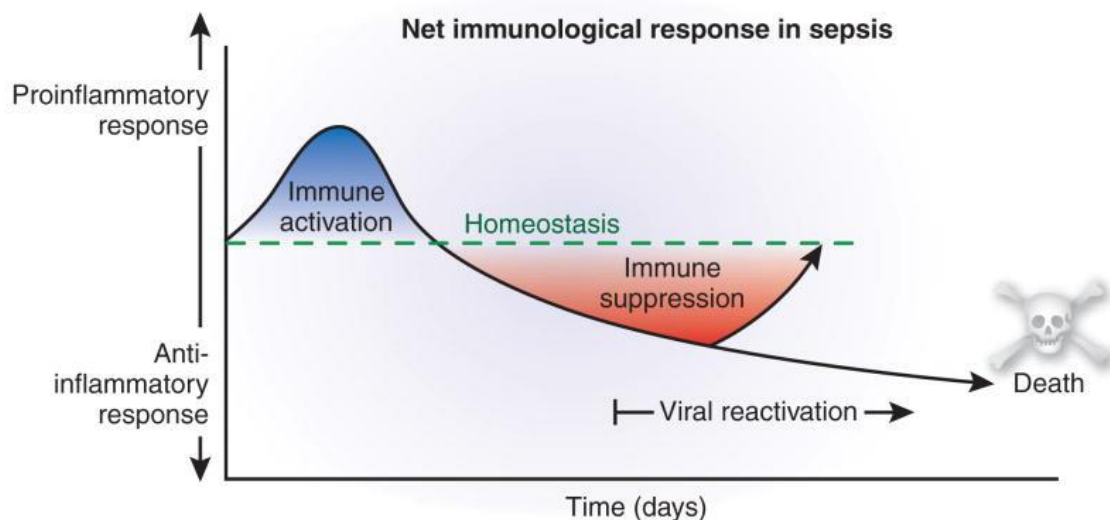


Abb. 1 Dysregulierte Immunantwort am Beispiel der Sepsis. Nach initialem Überwiegen der proinflammatorischen Immunantwort dominiert im weiteren Verlauf zunehmend die antiinflammatorische Gegenreaktion, die zu einer Immunsuppression mit Verlust der Infektkontrolle und letalem Ausgang führt [25].

Diese immunsuppressive Phase der Sepsis ist durch erhöhte Plasmakonzentrationen von antiinflammatorischen Zytokinen und durch Suppression der T-Zell-Funktion charakterisiert, was die proinflammatorische Zytokinproduktion und T-Zell-Proliferation nach Antigenstimulation dysreguliert [12, 29, 59]. Welche Mechanismen zu dieser T-Zell-Suppression führen, ist momentan noch unklar [6, 27]. Auch bei zahlreichen weiteren Erkrankungen konnte eine Dysregulation der T-Zell-Funktion beobachtet werden, beispielsweise

nach Trauma mit unzureichender Infektkontrolle und Immunsuppression, oder bei Leukämien mit gesteigerter Zellproliferation und maligner Entartung [13, 51, 63]. Trotz intensivster Forschungsbemühungen der letzten Jahrzehnte ist unser momentanes Verständnis der zugrundeliegenden Pathomechanismen begrenzt, und effektive und verlässliche Behandlungsmethoden der Erkrankungen sind selten verfügbar.

Die vorliegende Arbeit fasst die molekularbiologische Etablierung des purinergergen Signaling als entscheidenden Amplifikationsmechanismus für die Aktivierung der T-Zell-Funktion zusammen. Es konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass die T-Zell-Funktion durch autokrines und parakrines purinergeres Signaling gesteuert wird, und dass durch exogene Stimulation oder Inhibition dieser Mechanismen ein Eingreifen und eine Modulation der T-Zell-Aktivität und somit der Immunantwort bei verschiedenen Erkrankungen möglich ist.

2. Hintergrund

2.1. Purinerge Metaboliten und purinergeres Signaling

Das Nukleosid Adenosin besteht aus Adenin, als Purinbase namensgebend für das System des purinergeren Signaling, und dem Zuckermolekül β -D-Ribose. Zur Energiespeicherung wird an Adenosin über eine Esterbindung ein Phosphatrest als Adenosinmonophosphat (AMP), beziehungsweise über Anhydridbindungen ein zweiter und dritter Phosphatrest als Adenosindiphosphat (ADP) und Adenosintriphosphat (ATP) gebunden (Abb. 2). ATP ist im Intrazellulärraum normalerweise in sehr hohen Konzentrationen vorhanden und generiert so über die negativ geladene Plasmamembran einen starken, nach außen gerichteten Gradienten,

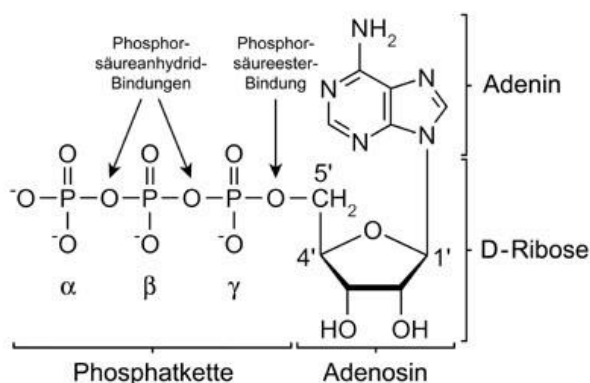


Abb. 2 Struktur von Adenosintriphosphat. ATP ist die universelle intrazelluläre Speicherform für chemische Energie.

sowohl chemisch wie auch elektrisch.

Daher resultiert jede Verletzung der Membranintegrität in einem sofortigen Efflux von ATP. Aufgrund seiner Ladung und niedrigen molekularen Masse diffundiert ATP schnell durch das wässrige Extrazellulärmilieu, bis es durch lösliche oder membranständige Ectonukleotidasen degradiert wird. [21, 22].

Lange Zeit wurde angenommen, dass Zellen das energiereiche und somit höchst wertvolle ATP nur im Rahmen solcher Zellschädigung als „danger signal“ [21], nie jedoch kontrolliert freisetzen würden.

Durch den Neurobiologen Geoffrey Burnstock konnte 1972 erstmals gezeigt werden, dass Neuronen ATP als Kotransmitter auf kontrolliertem Weg durch Exozytose oder Kanalproteine abgeben [10, 22]. Der entscheidende Durchbruch gelang Burnstock in den Neunzigerjahren, als zusätzlich die ersten ATP-Rezeptoren identifiziert werden konnten [11]. So wurde die Rolle des ATP als Signalmolekül mit kontrollierter Freisetzung und Zielrezeptor erstmals gezeigt. Hieraus entwickelte sich schnell das Forschungsfeld des purinergen Signalings. In den Folgejahren konnten Transmitterfunktionen für die verschiedenen Purinnukleotide wie ATP, ADP, AMP, Adenosin, Uridintriphosphat (UTP) und Urididindiphosphat (UDP) gezeigt und eine ganze Familie der purinergen Rezeptoren charakterisiert werden [33].

2.2. Purinerge Rezeptoren und extrazellulärer ATP-Metabolismus

Nach aktuellem Stand der Forschung setzt sich das Feld der purinergen Rezeptoren aus insgesamt 19 Rezeptoren zusammen, die im Laufe der vergangenen drei Jahrzehnte kloniert und charakterisiert werden konnten [33, 49]. Diese unterteilen sich in sieben intrinsische Ionenkanäle, den P2X-Rezeptoren (P2X1-7), acht transmembrane, G-Protein gekoppelte P2Y-Rezeptoren (P2Y1, 2, 4, 6, 11-14), sowie vier P1 Adenosinrezeptoren (A1, A2A, A2B, A3) [21, 33]. ATP ist der einzige physiologische Agonist für alle P2X-Rezeptoren (P2XR) und für P2Y11, und kann äquipotent mit UTP auch P2Y2 aktivieren. P2Y1, P2Y12 und P2Y13 werden vornehmlich durch ADP stimuliert, P2Y4 durch UTP, P2Y6 durch UDP, P2Y14 durch UDP-Glucose oder UDP-Galactose, und die P1R durch Adenosin (Abb. 3).

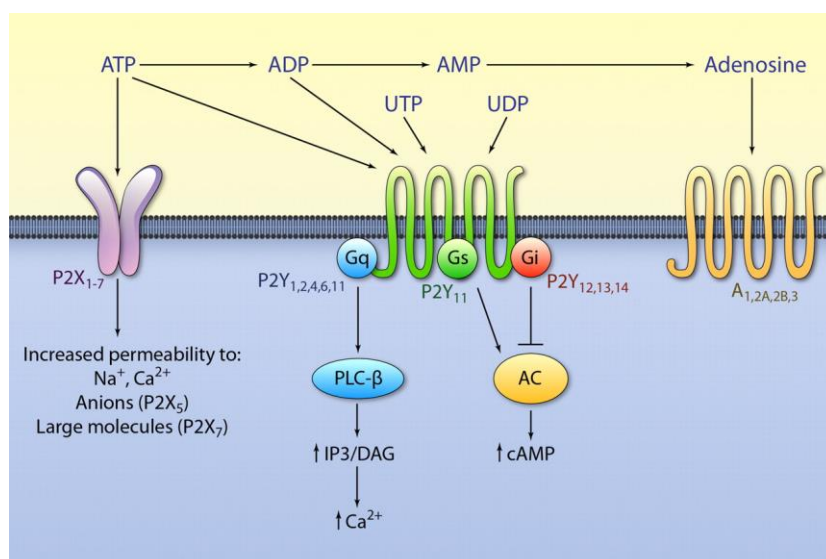


Abb. 3 Purinerge Rezeptoren.

Die Familie der purinergen Rezeptoren besteht aus drei Gruppen. Sieben P2XR, die nach Aktivierung durch ATP als Ionenkanäle fungieren, acht P2YR, die durch ADP, UTP oder UDP aktiviert werden und Signalwege über G-Proteine induzieren, sowie vier P1R, die nach Stimulation durch Adenosin ebenfalls G-Protein-vermittelte Signalwege aktivieren [67].

Die Affinität der Agonisten reicht vom unteren Mikromolarbereich für die meisten P2YR bis knapp in den Millimolarbereich für P2X7. Unter den purinergen Rezeptoren besitzt P2X7 eine Sonderstellung, da ATP hier in mikromolaren Konzentrationen die Funktion als Ionenkanal aktiviert, während Konzentrationen im millimolaren Bereich eine P2X7-vermittelte Ausbildung von Poren bewirkt, die an der Apoptose beteiligt sind [32]. Während die Gruppe der P2XR nach Stimulation durch ATP über einen Influx von Kationen, vornehmlich Ca^{2+} , zu einer Aktivierung der Zelle führt, können die P2YR und P1R, vermittelt über verschiedene G-Proteine, sowohl stimulierende als auch inhibierende Effekte auf die Zellfunktion ausüben [33].

Jeder extrazelluläre Botenstoff muss einer Form von Abbau unterliegen, um eine Überstimulation oder Desensibilisierung der Zielrezeptoren zu verhindern. Das purinerge Signaling bildet hiervon keine Ausnahme. Auf der Membranoberfläche der Zellen wie auch im Extrazellulärraum befinden sich sehr potente Ectonukleotidasen, die in vier Familien eingeteilt werden: Ectonucleosidtriphosphat-Diphosphohydrolasen (ENTPDasen), Ecto-5'-Nucleotidasen (5'-NT oder CD73), Ectonucleotidpyrophosphatasen und -phosphodiesterasen (ENPPs) und Alkalische Phosphatasen (APs) [21, 22], die ATP zu ADP, AMP und Adenosin hydrolysieren [71]. Durch Dephosphorylierung eines Liganden entsteht so ein weiterer potentieller Ligand für einen anderen Subtyp der purinergen Rezeptoren, der durch seine Aktivierung eine Verstärkung oder Hemmung des initialen Signals bewirken kann. Verschiedene Kombinationen dieser purinergen Rezeptoren und Ectonukleotidasen werden auf der Zelloberfläche fast jeder Zelle exprimiert und regulieren die Zellaktivierung durch das für den jeweiligen Zelltyp spezifisch exprimierte purinerge Signalsystem. Aufgrund der Anzahl der P2R Subtypen, ihrer Selektivität gegenüber verschiedenen Nukleotiden und der weit gestreuten Rezeptoraffinität besitzt das purinerge System eine beachtliche Plastizität und erlaubt es diesen Rezeptoren, Signalfunktionen in multiplen physiologischen Rollen zu erfüllen [21, 33].

2.3. Rolle des purinergen Signalings bei Granulozyten

Humane neutrophile Granulozyten können auf chemotaktische Gradienten reagieren, die sich in ihrer Konzentration entlang der Zelle um nur ein Prozent unterscheiden [70]. Da selbst bei solch geringen Gradienten verschiedene Moleküle der intrazellulären Signalübertragung eine starke Polarisierung aufweisen, wurde hierzu ein Amplifikationsmechanismus des chemotaktischen Signals vermutet. In einer vielbeachteten Arbeit konnte 2006 gezeigt werden, dass auch humane neutrophile Granulozyten kontrolliert ATP abgeben [16]. Nach Detektion des bakteriellen Chemotaxins N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) setzen

neutrophile Granulozyten kontrolliert und lokalisiert ATP frei, das durch Feedback über P2Y2 eine Polarisierung der Zelle bewirkt. Das extrazelluläre ATP wird schnell zu Adenosin hydrolysiert, welches dann die auf der sich polarisierenden Zelle an das vordere Ende umverteilten A3-Rezeptoren aktiviert und die Zellmigration fördert. Blockade der ATP-Rezeptoren oder der ATP-Freisetzung resultiert in einer hochgradigen Hemmung der Chemotaxis [16, 17]. Neutrophile Granulozyten benötigen demnach ein intaktes purinerges Signaling bestehend aus ATP-Freisetzung und autokrinem Feedback über P2Y2 und A3-Rezeptoren zur Signalamplifikation, zur Wahrnehmung des Gradienten und zur erfolgreichen Migration und Immunabwehr.

3. Fragestellung

Bei der Aktivierung des adaptiven Immunsystems spielen CD4⁺ T-Zellen eine zentrale Rolle. Nach Stimulation des T-Zell-Rezeptors (TCR) hängen Art und Stärke der T-Zell-Aktivierung dabei von vielen kostimulierenden Faktoren ab [14, 31]. Die Antigenerkennung von T-Zellen wird durch TCR vermittelt, die sich an der Immunsynapse befinden und mit Peptiden interagieren, welche auf MHC-Molekülen von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) präsentiert werden. Eine erstaunlich geringe Anzahl von Peptid-MHC Komplexen wird zur T-Zell-Aktivierung benötigt [57] und es ist nicht bekannt, wie solch schwache Signale in der Lage sind, während der kurzen Interaktion mit einer APC die T-Zelle zu aktivieren. Um mit hoher Sensitivität und Selektivität auf die Antigene reagieren zu können, müssen T-Zellen Mechanismen besitzen, die eine Signalamplifikation erlauben [58]. Vorarbeiten konnten zeigen, dass Adenosin einen hemmenden Effekt auf T-Zellen hat [68].

Es sollte mit den hier zusammengefassten Projekten geklärt werden, ob humane CD4⁺ T-Zellen das System des purinergen Signalings zur Zellaktivierung nutzen und ob gegebenenfalls Möglichkeiten zur Beeinflussung dieses Systems und damit der T-Zell-Funktion bestehen.

Anhand der durchgeführten Studien sollten die folgenden Fragestellungen adressiert werden:

3.1. Exprimieren T-Zellen aktivierende Komponenten des purinergen Signalings?

Besitzen humane T-Zellen die Voraussetzung zur kontrollierten Freisetzung von Nukleotiden, verändert Zellstimulation die extrazellulären Nukleotidkonzentrationen, und exprimieren T-Zellen die entsprechenden purinergen Zielrezeptoren?

3.2. Beeinflusst das purinerge System die T-Zell-Aktivierung?

Auf welche Art und in welchem Ausmaß beeinflusst dieses purinerge System intrazelluläre Signalwege und Effektorfunktionen der T-Zelle? Ist es möglich, die Signalfunktion des purinergen Systems durch exogene Modulation, beispielsweise pharmakologisch, zu beeinflussen?

3.3. Besitzt das purinerge Signaling klinische Relevanz und therapeutisches Potential?

Gibt es Hinweise auf eine Dysregulation der purinergen T-Zell-Funktion bei Erkrankungen, und könnten hier Modulationen einen therapeutischen Ansatz bieten?

4. Ergebnisse

4.1. Expression des purinergen Systems in T-Zellen

Um zu untersuchen, ob CD4⁺ T-Zellen mit den nötigen Voraussetzungen für eine Aktivierung durch purinerges Signaling ausgestattet sind, wurden Expressionsanalysen der purinergen Rezeptoren mit der humanen CD4⁺ T-Zell-Linie Jurkat und mit primären humanen CD4⁺ T-Zellen durchgeführt. Mit Hilfe der real-time Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) konnte jeweils mRNA für die purinergen Rezeptoren P2X1, P2X4, P2X5 und P2X7 [65, 69], für P2Y1 und P2Y12 [64], sowie für A2A, A2B und A3 [68] detektiert werden. Vorangehende Studien hatten eine inhibierende Funktion für die Gruppe der Adenosinrezeptoren [68], und für P2X5 eine geringe Kalziumpermeation und niedrigere Oberflächenexpression im Vergleich zu P2X1, P2X4 und P2X7 beschrieben [5, 32]. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die weiteren Studien zur T-Zell-Aktivierung mit den Subtypen P2X1, P2X4, P2X7 sowie P2Y1 und P2Y12 durchgeführt. Um die mRNA-Expression auf Proteinebene zu bestätigen und um die Oberflächenexpression dieser Rezeptoren nachzuweisen, führten wir immunzytochemische Färbungen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern durch. Hier zeigte sich für alle drei P2XR Subtypen [65, 69] sowie für P2Y1 und P2Y12 [64] eine deutliche Oberflächenexpression auf Jurkat T-Zellen sowie auf primären humanen CD4⁺ T-Zellen.

Zur Beantwortung der Frage, ob CD4⁺ T-Zellen kontrolliert ATP und andere Nukleotide als Liganden für diese Rezeptoren freisetzen, wurden T-Zellen in Kultur mittels anti-CD3/anti-CD28-Antikörper tragender Beads für verschiedene Zeitintervalle stimuliert. Diese Beads binden mit ihren Antikörpern an den TCR/CD28-Komplex der T-Zelle und simulieren dadurch eine physiologische Aktivierung durch eine APC. In den Zellüberständen wurden nach

verschieden langen Inkubationsintervallen mittels High-Performance Liquid Chromatographie (HPLC) die Konzentrationen von ATP, ADP, AMP und Adenosin gemessen. Nach Stimulation des TCR stieg bei isolierten humanen CD4⁺ T-Zellen die extrazelluläre ATP-Konzentration im Zellüberstand innerhalb von 30 Sekunden um über das Zehnfache der basalen Menge [64, 69]. Der Anstieg von extrazellulärem ATP wurde von einer Erhöhung der extrazellulären ADP- und AMP-Konzentrationen begleitet (Abb. 4). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass ein Teil des freigesetzten ATP durch Ectonucleotidasen schnell zu ADP und AMP hydrolysiert wird. Diese Annahme wird durch die Beobachtung unterstützt, dass unstimulierte primäre CD4⁺ T-Zellen und Jurkat T-Zellen in der Lage sind, exogen zugegebenes ATP schnell zu ADP und AMP sowie Adenosin abzubauen [38]. CD4⁺ T-Zellen waren auch in der Lage, innerhalb einer Stunde etwa 50% von exogen zugegebenem ADP zu AMP und Adenosin zu hydrolysieren [64]. Zusätzlich wurde mittels neuer fluoreszenzmikroskopischer Methoden visualisiert, wie die Stimulation des TCR eine schnelle Freisetzung von ATP bewirkte [18, 37]. Die hierbei direkt über der Zellmembran gemessenen Konzentrationen erreichten >60 μM innerhalb von 2 min nach Zellstimulation (Abb. 4 A, B) [64, 69]. Diese ATP Konzentrationen reichen aus, um ATP-Rezeptoren zu stimulieren, sind allerdings niedriger als die Konzentrationen, die nötig sind, um durch P2X7 Apoptose in T-Zellen zu induzieren [2, 69].

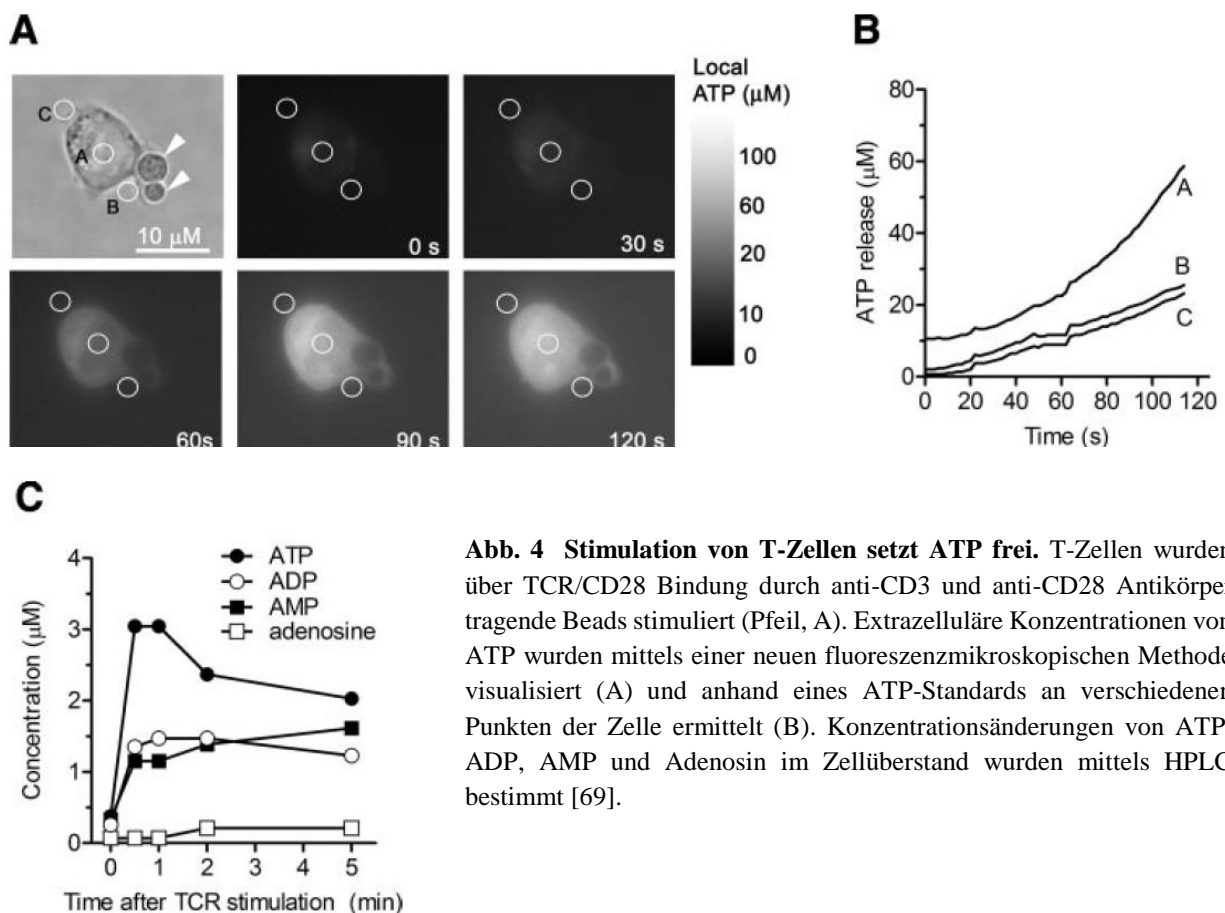


Abb. 4 Stimulation von T-Zellen setzt ATP frei. T-Zellen wurden über TCR/CD28 Bindung durch anti-CD3 und anti-CD28 Antikörper tragende Beads stimuliert (Pfeil, A). Extrazelluläre Konzentrationen von ATP wurden mittels einer neuen fluoreszenzmikroskopischen Methode visualisiert (A) und anhand eines ATP-Standards an verschiedenen Punkten der Zelle ermittelt (B). Konzentrationsänderungen von ATP, ADP, AMP und Adenosin im Zellüberstand wurden mittels HPLC bestimmt [69].

Die Freisetzung von ATP kann auf vielen Wegen erfolgen. Entweder kommt es zu einer unkontrollierten Freisetzung im Rahmen des Zelltods, oder zu einer kontrollierten Abgabe durch Exozytose oder über Kanalproteine. Ein interessantes Kanalprotein und vielversprechender Kandidat für einen ATP-Freisetzungskanal bei T-Zellen ist das mit der Familie der Connexine verwandte Pannexin-1. Als Hemikanal kann Pannexin-1 Zell-Zell-Verbindungen bilden und den Austausch von Molekülen zwischen den verbundenen Zellen ermöglichen. Pannexin-1 wird durch Membrandepolarisation, mechanische Perturbation [4] oder intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg [40] auch während zellulärer Energiedepletion [55] aktiviert und erlaubt die Permeation kleiner Moleküle inklusive ATP [8, 9, 47]. Bei neutrophilen Granulozyten wurde Pannexin-1 bereits als relevanter ATP-Freisetzungskanal identifiziert [15]. In den durchgeführten immunzytochemischen Experimenten konnten wir bei CD4^+ T-Zellen ebenfalls eine hohe Oberflächenexpression von Pannexin-1 feststellen [65].

Durch diese Experimente konnte gezeigt werden, dass T-Zellen mit Pannexin-1 einen potentiellen Weg der kontrollierten ATP-Freisetzung besitzen, nach TCR-Stimulation die extrazellulären Nukleotidkonzentrationen steigen, und ATP und ADP nach T-Zell-Stimulation in relevanten Konzentrationen als Liganden für die auf mRNA- und Proteinebene exprimierten P2XR und P2YR zur Verfügung stehen. Somit exprimieren CD4^+ T Zellen alle benötigten Komponenten für purinerges Signaling. Im Weiteren wurde die funktionelle Relevanz der exprimierten Rezeptoren, der Liganden und der potentiellen Freisetzungskanäle evaluiert.

4.2. Funktion des purinergen Systems in T-Zellen

Die molekularen Mechanismen der P2R-vermittelten Zellaktivierung konnten in verschiedenen Zelltypen etabliert werden. Eine Aktivierung der Ionenkanäle P2X1, P2X4 und P2X7 durch ATP bewirkt einen schnellen und selektiven Einstrom von Kationen wie Ca^{2+} in den Intrazellulärraum [44]. Die über P2Y1 und P2Y12 vermittelte Antwort erfolgt nach Aktivierung durch ADP über G-Proteine. Stimulation von P2Y1 führt über $\text{G}_{q/11}$ -Proteine zu einer Aktivierung der Phospholipase C_β , die das Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) in die Second Messenger Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3) spaltet. IP3 aktiviert Ca^{2+} -Kanäle des glatten endoplasmatischen Retikulums (ER) und bewirkt so einen Anstieg der cytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration. Die zelluläre Aktivierung über P2Y12 wird durch $\text{G}_{i/o}$ -Proteine vermittelt, die hauptsächlich über die Hemmung der Adenylatzyklase eine Verminderung von zyklischem AMP (cAMP) bewirkt, und hierdurch eine Stimulation multipler aktivierender Signalwege [3, 54, 61]. Zusätzlich erfolgt nach TCR-

Stimulation eine Phosphorylierung und damit Aktivierung verschiedener mitogen-activated protein (MAP) Kinasen [19].

Voraussetzung für die T-Zell-Aktivierung ist eine anhaltende Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Der Anstieg des Ca^{2+} -Levels trägt zur Aktivierung des Nuclear Factor of Activated T-Cells (NFAT) bei, der die Transkription von Interleukin (IL)-2 und weitere Signalkaskaden zur T-Zell-Proliferation induziert [23, 65].

4.2.1. Ca^{2+} Signaling

Um den Einfluss von extrazellulärem ATP auf die Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bei T-Zellen zu untersuchen, wurden die ATP-hydrolysierenden Enzyme Apyrase oder Alkalische Phosphatase dem Kulturmedium hinzugefügt. Nach Beladung der Zellen mit dem Calciumindikator Fura-2 wurden die Zellen mit Antikörpern gegen den TCR stimuliert. Beide Nucleotid-hydrolysierenden Enzyme konnten das intrazelluläre Ca^{2+} -Signal stimulierter T-Zellen signifikant reduzieren. Diese Ergebnisse legen nahe, dass ATP, welches in das extrazelluläre Milieu abgegeben wird, für Ca^{2+} -Einstrom und gegebenenfalls für folgende T-Zell-Aktivierungsprozesse essentiell ist [69].

Um den jeweiligen Beitrag der detektierten P2XR zur Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration molekulargenetisch zu untersuchen, wurde die Expression der P2R mittels Gen-Silencing durch siRNA unterdrückt. Aufgrund der unzureichenden Transfektionseffizienz bei primären T-Zellen wurden für Transfektionsexperimente Jurkat T-Zellen verwendet. Cy3-markierte nonsense-siRNA zeigte eine Aufnahme der siRNA in 95% der behandelten Jurkat T-Zellen, und das erfolgreiche Silencing der jeweiligen mRNA wurde durch RT-qPCR bestätigt. Nach Beladung mit dem intrazellulären Calciumindikator Fluo-4 AM wurden die mit siRNA transfizierten T-Zellen über den TCR mit anti-CD3-Antikörpern stimuliert und die Zunahme der Fluoreszenz über die Zeit mittels Durchflusszytometrie oder Fluoreszenzmikroskopie gemessen. Wir konnten zeigen, dass Silencing von P2X1, P2X4 oder P2X7 das Ca^{2+} -Signaling als Antwort auf die TCR Stimulation verminderte, mit der ausgeprägtesten Verminderung durch Silencing von P2X4. Durch ein kombiniertes Silencing aller drei Rezeptoren konnte das Ca^{2+} -Signal nahezu komplett unterdrückt werden [65, 69]. Somit spielen alle drei untersuchten P2XR eine Rolle im Ca^{2+} -Influx während der T-Zell-Aktivierung.

Um die Möglichkeit der pharmakologischen Modulation bei humanen primären CD4^+ T-Zellen zu untersuchen, verwendeten wir kommerziell verfügbare Inhibitoren der P2XR. Ähnlich wie in unseren Silencing-Experimenten mit Jurkat T-Zellen konnten wir beobachten, dass eine Rezeptorblockade durch den unspezifischen P2R-Antagonist Suramin den Ca^{2+} -Influx als

Reaktion auf TCR Stimulation fast komplett verminderte [69]. NF023, ein P2X1 Antagonist, 5-BDBD, ein Antagonist für P2X4, und oATP, ein P2X7 Antagonist, hemmten den Ca^{2+} -Influx jeweils signifikant [64, 65, 69]. Eine pharmakologische Hemmung von P2Y1 mit MRS2279 verminderte und verzögerte das intrazelluläre Ca^{2+} -Signal auf TCR-Stimulation ebenfalls signifikant, jedoch deutlich schwächer als die jeweiligen P2XR [64]. Mit P2Y12 wurden aufgrund des cAMP-vermittelten Signalwegs keine Ca^{2+} -Experimente durchgeführt.

Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass jeder der untersuchten Rezeptoren eine Relevanz in der Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} nach TCR-Stimulation besitzt, mit dem stärksten Influx durch P2X4.

4.2.2. NFAT-Aktivierung

Die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der NFAT-Familie. NFAT wird benötigt, um die IL-2 Genexpression zu initiieren und um T-Zell-Aktivierungsprozesse zu fördern [24].

Mittels eines NFAT-Luciferase Reporter Assays konnten wir zeigen, dass eine Überexpression von P2X1 oder P2X7 die NFAT-Aktivierung durch TCR/CD28 Stimulation deutlich verstärkte. Bei hoher nativer P2X4 Expression war die Erhöhung durch P2X4 Überexpression nicht signifikant. Umgekehrt verminderte eine Überexpression von durch Punktmutation funktionsunfähig gemachten Rezeptoren P2X1 (T18A), P2X4 (L352Q) oder P2X7 (T1729A) die NFAT-Aktivierung. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurde die Genexpression dieser P2XR mittels siRNA vorübergehend unterdrückt. Hierbei zeigte sich ebenfalls für alle drei untersuchten Rezeptoren eine signifikante Reduktion der NFAT-Aktivierung [65, 69].

4.2.3. Interleukin-2 Genexpression

IL-2 wird von aktivierten T-Zellen gebildet und dient über autokrine Stimulation der weiteren Zellaktivierung und -differenzierung. Entsprechend der Verstärkung der NFAT-Aktivierung konnten wir bei einer Überexpression von P2X1, P2X4 oder P2X7 eine deutliche Zunahme der IL-2 Genexpression nach TCR-Stimulation beobachten. Umgekehrt verminderte das Silencing von P2X1, P2X4, oder P2X7 die IL-2 mRNA Transkription signifikant. Das kombinierte Silencing aller drei untersuchten Rezeptoren gleichzeitig resultierte in einer Reduktion der TCR/CD28-

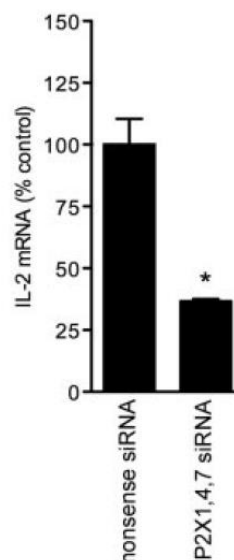


Abb 5. Silencing von P2XR. Kombiniertes Silencing von P2X1, P2X4 und P2X7 reduzierte die IL-2 Genexpression von Jurkat T-Zellen nach TCR-Stimulation um ca. 65% im Vergleich zu nonsense-siRNA transfizierten T-Zellen. n=3, Student's *t*-test, **p*<0,05 [69].

induzierten IL-2 Genexpression um ca. 65% und war damit ausgeprägter als das separate Silencing der einzelnen Rezeptoren (Abb. 5). Dies weist darauf hin, dass alle drei P2R Subtypen zur TCR-induzierten T-Zell-Aktivierung beitragen [65, 69].

Um die Rolle von P2X1, P2X4 und P2X7 bei der Aktivierung von primären T-Zellen zu untersuchen, führten wir Experimente mit P2R-Antagonisten mit primären humanen und Maus-T-Zellen durch. Die pharmakologische Hemmung mit dem nicht selektiven P2XR-Antagonisten Suramin oder mit dem P2X1 und P2X4 selektiven Inhibitor TNP-ATP reduzierte die IL2-mRNA Expression nach TCR/CD28-Stimulation um ungefähr 50%, während die P2X1- bzw. P2X7-selektiven Antagonisten NF023 und A438079 eine Hemmung von jeweils ungefähr 25% bewirkten. Alle untersuchten pharmakologischen Inhibitoren unterdrückten die IL-2 Transkription in T-Zellen von Mäusen stärker als in menschlichen T-Zellen, was durch eine Variation in P2XR-Expressionsmustern und durch Unterschiede in der Inhibitionseffizienz der Rezeptorantagonisten bedingt sein kann [30, 44, 53, 56].

Nach TCR-Stimulation wurden nahe der Zellmembran ATP-Konzentrationen von 60-80 μM gemessen. Um dieses extrazelluläre ATP schnell abzubauen und den stimulierenden Liganden für P2XR zu entfernen, wurden die Enzyme Apyrase oder Alkalische Phosphatase dem Kulturmedium vor Zellstimulation zugegeben. Ähnlich dem beobachteten Effekt einer Verminderung des Ca^{2+} -Signals nach TCR-Stimulation konnte auch hierbei eine Verminderung der IL-2-Transkription um 50% erreicht werden (Abb. 6 A) [69]. Umgekehrt führte eine TCR-Stimulation von Jurkat T-Zellen nach exogener Zugabe von 100 μM ATP zu einer Verstärkung

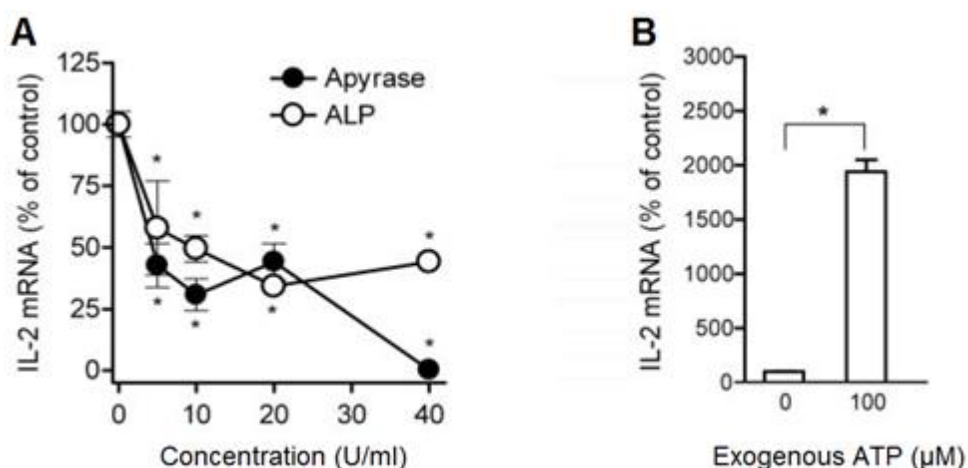


Abb. 6 IL-2 Transkription in Abhängigkeit von extrazellulärem ATP. Degradierung von ATP durch Zugabe von Apyrase oder Alkalischer Phosphatase (ALP) konnte die Bildung von IL-2 mRNA deutlich reduzieren (A), während die Zugabe von 100 μM ATP die IL-2 Transkription nach TCR/CD28 Stimulation signifikant erhöhte (B). n=3, student's *t*-test, *p<0,05 [69].

der IL-2-Transkription auf das 47-fache im Vergleich zu Kontrollen, die ohne zusätzliches ATP stimuliert wurden (Abb. 6 B).

C57BL/6 Mäuse weisen eine Mutation in ihrem Gen für P2X7 auf, welche die Rezeptorfunktion beeinträchtigt. BALB/c Mäuse exprimieren einen voll funktionsfähigen P2X7 Rezeptor. Entsprechend sind T-Zellen von BALB/c Mäusen empfindlicher für ATP als T-Zellen von C57BL/6 Mäusen. Wir verwendeten Splenozyten dieser beiden Mauslinien, um die Rolle von P2X7 in der T-Zell-Aktivierung weiter zu untersuchen. Die Lymphozyten der BALB/c Mäuse zeigten auf Stimulation eine starke IL-2 Produktion in der intrazellulären Zytokinfärbung, während in den Lymphozyten der C57BL/6 Mäuse keine IL-2 Produktion induziert wurde [69]. In anderen Studien wurde die ATP-induzierte Zellantwort verschiedener T-Zell-Subtypen von C57BL/6, BALB/c und P2X7-Knockout Mäusen untersucht. Es konnte eine verstärkte Proliferation der CD4⁺ T Zellen von BALB/c, jedoch nicht von C57BL/6 und P2X7-Knockout Mäusen beobachtet werden [2].

Ähnlich wie bei den ionotropen P2XR beobachtet, zeigte sich eine deutliche Zunahme der IL-2 Gentranskription durch Überexpression der ADP-Rezeptoren P2Y1 [64] und P2Y12 (nicht publiziert), sowie umgekehrt eine signifikante Reduktion der IL-2 mRNA Expression nach Silencing von P2Y1 [64] und P2Y12 (nicht publiziert). Durch Zugabe von exogenem ADP oder den nicht-hydrolysierbaren ADP Analoga ADPβS oder Me-S-ADP vor TCR/CD28-Stimulation konnte die Transkription von IL-2 um 25-50% gesteigert werden, während eine Vorbehandlung der T-Zellen mit dem P2Y1-Antagonisten MRS2279 die IL-2 Genexpression dosisabhängig auf bis zu 50% reduzieren konnte [64].

Diese Ergebnisse zeigen, dass extrazelluläres ADP und autokrine wie parakrine Stimulation von P2Y1 und P2Y12 synergistisch mit der ATP-abhängigen Stimulierung von P2X1, P2X4 und P2X7 zur T-Zell-Aktivierung und einer funktionalen T-Zell-Antwort beitragen.

4.2.4. Rezeptordistribution zur Immunsynapse

Die Ausbildung einer sogenannten Immunsynapse zwischen T-Zelle und APC ist die Voraussetzung für eine antigenvermittelte T-Zell-Aktivierung. Diese Immunsynapse ist eine komplexe Struktur mit einer limitierten Anzahl an TCRs. Da diese geringe Anzahl an TCRs in der Lage ist, ein ausreichend starkes Signal zur Zellaktivierung auszulösen, liegt es nahe, dass das TCR-Signal zur Zellstimulation eine Signalamplifikation benötigt [60].

Um die potentielle Rolle von P2X1 und P2X4 an der Immunsynapse zu untersuchen, wurden Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP)-markierte Rezeptorkonstrukte in Jurkat T-Zellen exprimiert. Nach Stimulation der Zellen mit anti-CD3- und anti-CD28-beladenen Beads

aggregierten die EGFP-markierten P2X1 und P2X4 Rezeptoren in Clustern und translozierten zu der Kontaktstelle mit den Beads. Ein großer Anteil von P2X4 wurde bereits innerhalb von 2 Minuten nach Stimulation umverteilt (Abb. 7). Die Zellstimulation reduzierte zudem die Menge an fluoreszenten submembranösen Vesikeln, was auf eine Integration von rezeptorbeladenen

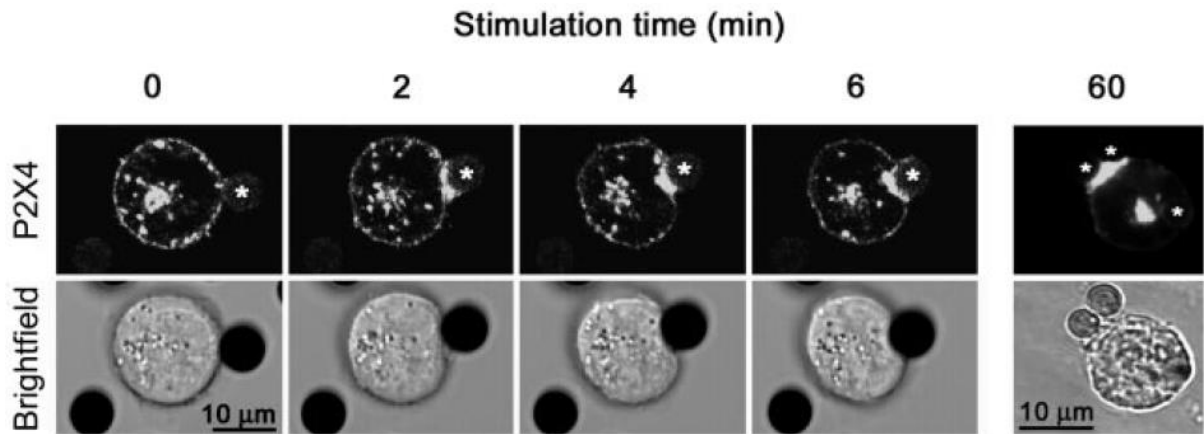


Abb. 7 Translokation von P2X4 zur Immunsynapse. Darstellung der Expression und Translokation des EGFP-markierten P2X4-Rezeptorkonstrukts nach Stimulation durch einen mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern beladenen Bead (*) mittels konfokaler Laserscannmikroskopie. Die innerhalb von 2 Minuten ausgebildete Synapse bleibt für mindestens 60 Minuten bestehen [65].

Vesikeln in die Zellmembran hindeutet. Für P2X1 wurde ebenfalls eine Rezeptorumverteilung innerhalb von 2-6 min beobachtet, wobei dieser Translokationsprozess langsamer als der von P2X4 erfolgte und etwa 15 min für eine deutliche Rezeptorakkumulation an der Kontaktstelle benötigte. Obwohl sich die initiale Kinetik für P2X1 und P2X4 unterschied, blieben beide Rezeptorsubtypen für mindestens eine Stunde nach Zellstimulation eng mit der Synapse assoziiert [65].

Um diese Ergebnisse mit primären humanen CD4⁺ T-Zellen zu bestätigen, wurden native T-Zellen für verschiedene Zeitintervalle mit den Aktivierungsbeads stimuliert, fixiert, und die entsprechenden Rezeptoren immunzytochemisch angefärbt. Hierbei konnten wir beobachten, dass P2X1, P2X4 [65] und P2Y1 [64] auch in primären CD4⁺ T-Zellen mit ähnlicher Kinetik zur Immunsynapse umverteilt wurden. Anders als P2X1, P2X4 und P2Y1 zeigten P2X7 und P2Y12 keine Umverteilung, sondern blieben gleichmäßig an der Zelloberfläche verteilt. Diese Ergebnisse legen nahe, dass P2X7 und P2Y12 weniger auf eine lokale ATP- bzw. ADP-Freisetzung angewiesen sind, während P2X1, P2X4 und P2Y1 durch ihre Translokation an die Synapse das TCR-induzierte Signal nach Aktivierung durch kontrolliert freigesetztes ATP oder ADP amplifizieren, und P2X1 und P2X4 hier lokalisiert zum Ca²⁺-Einstrom beitragen [64, 65].

Um diesen lokalisierten Ca^{2+} -Einstrom weiter zu untersuchen, suspendierten wir Fluo-4 AM beladene Jurkat T-Zellen in Ca^{2+} -freiem Medium und stimulierten die Zellen für 30 min mit anti-TCR/anti-CD28 beladenen Beads, um die Ausbildung einer Immunsynapse zu erreichen. Nachdem extrazelluläres Ca^{2+} dem Medium zugegeben wurde, konnten wir mit konfokaler Laserscanning-Mikroskopie einen Ca^{2+} -Einstrom beobachten, der an der Immunsynapse stattfand (Abb. 8) [65].

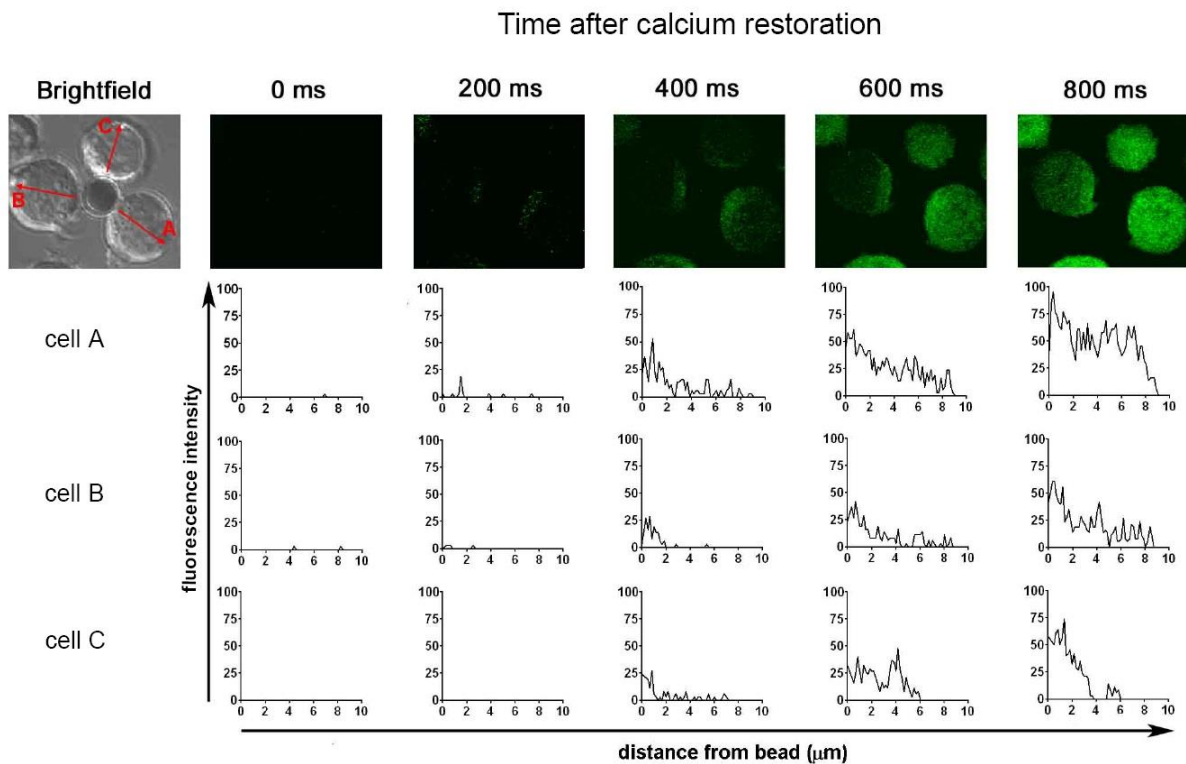


Abb. 8 Calciumeinstrom an der Immunsynapse. T-Zellen wurden mit dem Calciumindikator Fluo-4 AM beladen und für 30 Minuten mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörper tragenden Beads in Ca^{2+} -freiem Medium stimuliert, um die Ausbildung einer Immunsynapse zu gewährleisten. Danach wurde dem Medium Ca^{2+} zugegeben und die Ausbreitung des Fluoreszenzsignals ausgehend von der Immunsynapse mittels konfokaler Laserscannmikroskopie erfasst [65].

Zusammenfassend legen die durchgeführten Experimente nahe, dass P2X1, P2X4 und P2Y1 zum Ca^{2+} -Signaling an der Immunsynapse von T-Zellen beitragen. Während P2X1, P2X4 und P2Y1 zur Immunsynapse wandern, bleiben P2X7 und P2Y12 gleichmäßig verteilt, was darauf hindeutet, dass die zelluläre Lokalisation dieser Rezeptorsubtypen dabei hilft, ihre Rolle in der T-Zell-Aktivierung zu definieren.

4.2.5. Translokalisierung von Pannexin-1 zur Immunsynapse

Pannexin-1 ist ein sogenannter Hemikanal, für den eine Rolle in der ATP-Freisetzung aus aktivierten T-Zellen gezeigt wurde [42, 52]. Wir konnten zeigen, dass Pannexin-1 gleichmäßig auf der Zelloberfläche von unstimulierten primären CD4^{+} T Zellen verteilt ist, aber analog zu

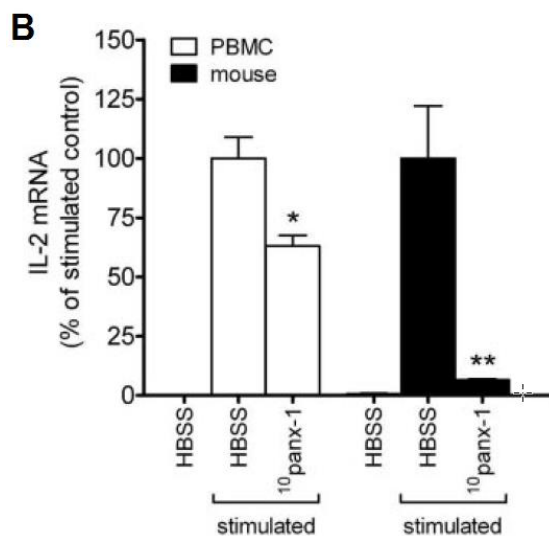
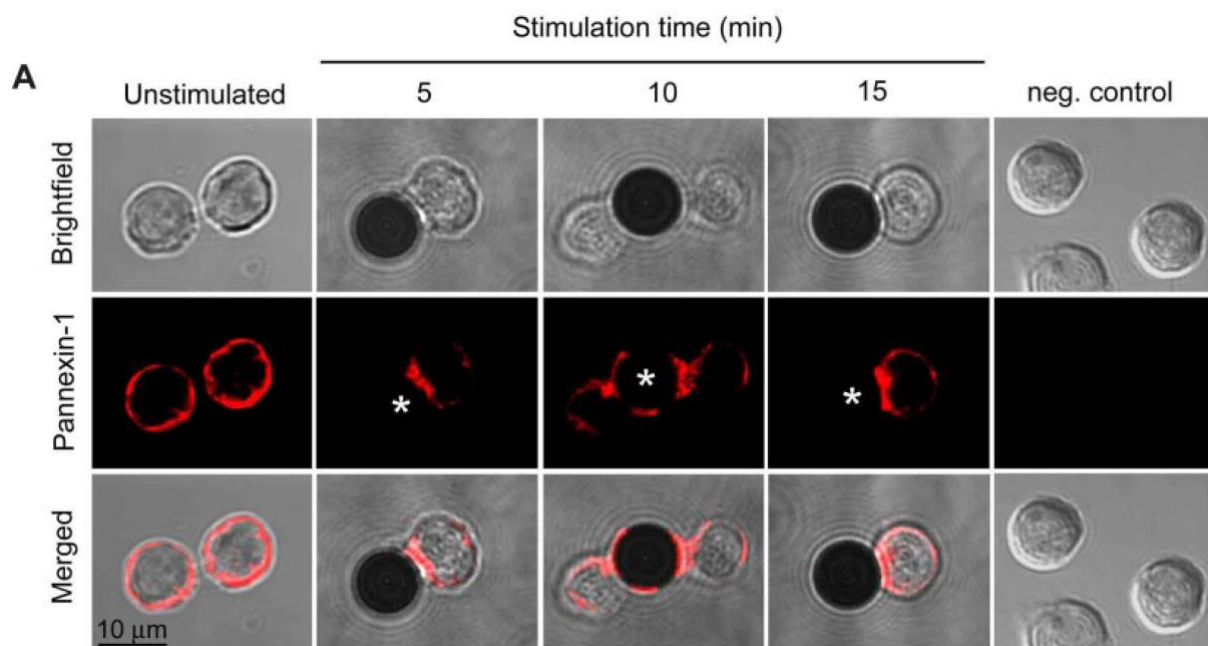


Abb. 9 Pannexin-1 trägt zur ATP-Freisetzung an der Immunsynapse bei. Stimulation des TCR von primären humanen CD4⁺ T-Zellen führt zur Translokation von Pannexin-1 an die Immunsynapse (A). Hemmung von Pannexin-1 mit 10^6 panx-1 verminderte die IL-2 Transkription in humanen PBMC und Splenozyten von BALB/c Mäusen (B) nach TCR-Stimulation. n=3, Student's *t*-test, p<0,05 [65].

P2X1, P2X4 und P2Y1 nach TCR/CD28-Stimulation innerhalb von 5 min zu der sich bildenden Immunsynapse umverteilt wird (Abb. 9 A). Diese schnelle Translokation weist darauf hin, dass Pannexin-1 zu einem autokrinen Feedback bei TCR-Stimulation an der Immunsynapse beiträgt. Diese Annahme wird dadurch zusätzlich untermauert, dass eine Inhibierung von Pannexin-1 mit dem gap junction Inhibitor Carbenoxolone (CBX) die TCR-induzierte ATP-Freisetzung und IL-2 Gentranskription blockierte [65]. Die Behandlung von T-Zellen mit dem spezifischen Pannexin-1 Hemmer 10^6 panx-1 reduzierte den Ca²⁺-Einstrom nach TCR-Stimulation und inhibierte die IL-2 Transkription von humanen CD4⁺ T-Zellen und von T-Zellen von Mäusen (Abb. 9 B) [65].

4.2.6. Einfluss auf die Mitochondrienaktivität

Frühere Experimente konnten zeigen, dass Mitochondrien ebenfalls an der Immunsynapse akkumulieren [48]. Mitochondrien sind für die Produktion des ATP verantwortlich, welches von den T-Zellen nach TCR/CD28 Stimulation freigesetzt wird [36]. ATP entsteht in den Mitochondrien durch oxidative Phosphorylierung. Mehrere der daran beteiligten Enzyme benötigen für ihre Aktivierung Ca^{2+} , das dafür in die Mitochondrien aufgenommen werden muss. Da P2X4 und P2Y1 am stärksten zu der Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Levels nach TCR/CD28 Stimulation beitragen, untersuchten wir den Einfluss dieser beiden Rezeptoren auf die mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme. Hierfür wurden Jurkat T-Zellen mit dem mitochondrialen Ca^{2+} Indikator mito-CAR-GECO1 transfiziert. Wir konnten zeigen, dass die TCR/CD28 Stimulation einen steilen Anstieg der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme triggerte, der durch Vorbehandlung mit dem P2X4 Antagonisten 5-BDBD nahezu komplett unterdrückt werden konnte. Hemmung von P2Y1 mit MRS2279 oder Vorbehandlung mit dem unspezifischen P2R Antagonisten Suramin verminderte diesen mitochondrialen Ca^{2+} -Anstieg ebenfalls [64].

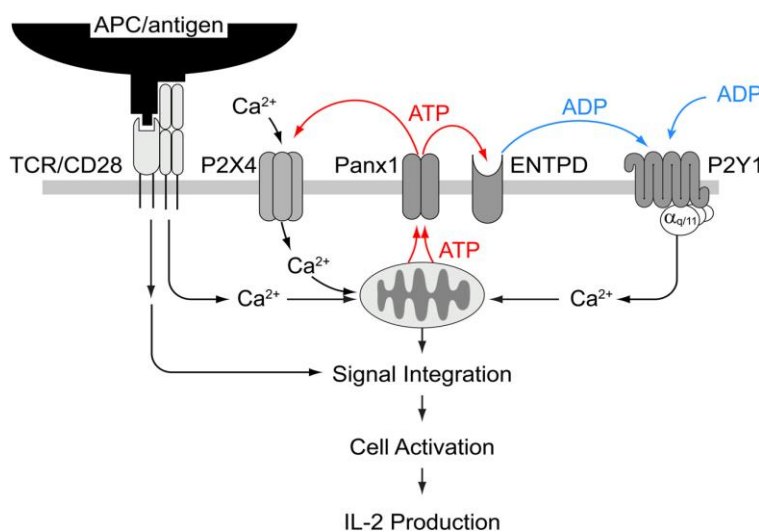


Abb. 10 Modell der T-Zell-Aktivierung durch P2X4 und P2Y1. Stimulation des TCR/CD28 Komplexes triggert mitochondriale ATP-Produktion und ATP-Freisetzung durch Pannexin-1. Das freigesetzte ATP aktiviert P2X4 und verstärkt den Ca^{2+} Influx. Hydrolyse von ATP durch ENTPDasen generiert ADP, das P2Y1 aktiviert und durch Ca^{2+} Freisetzung aus dem ER zur Erhöhung des cytoplasmatischen Ca^{2+} beiträgt. Dies stellt einen feed-forward Signalmechanismus dar, der die T-Zell-Aktivierung und folgende Signalwege verstärkt und die IL-2 Transkription und Effektorfunktionen ermöglicht [64].

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass sowohl P2X4 wie auch P2Y1 nicht nur den cytosolischen Ca^{2+} -Anstieg, sondern auch die mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme synergistisch regulieren.

Mit den hier zusammengefassten molekularbiologischen Studien konnte gezeigt werden, dass die Stimulation des TCR zu einer Akkumulation von Mitochondrien, Pannexin-1 und P2 Rezeptoren an der Immunsynapse führt. Freigesetztes ATP und durch Ectonukleotidaseaktivität

entstehendes ADP führen zu einer Aktivierung der purinergen Rezeptoren. Diese triggern den lokalisierten Influx und die intrazelluläre Freisetzung von Ca^{2+} und führen so zu einer weiteren Stimulation der Mitochondrien und zur Aufrechterhaltung der T-Zell-Aktivierung.

4.3. Klinische Relevanz und therapeutische Modulation des purinergen Signalings

T-Zellen sind als zentrale Zellen des adaptiven Immunsystems von essentieller Bedeutung für eine effektive Immunabwehr des menschlichen Organismus. Dysfunktionen können zu verschiedenen Krankheitsbildern führen. Durch die Charakterisierung und das Verständnis des purinergen Signalings der T-Zellen eröffnet sich somit die Möglichkeit, den zugrundeliegenden Pathomechanismus der jeweiligen Erkrankung besser zu verstehen, und im optimalen Fall durch eine Manipulation des purinergen Signalings therapeutisch auf die Erkrankung einwirken zu können.

4.3.1. Hyperosmolare NaCl-Lösung zur Immunmodulation

Suppression der T-Zell-Funktion nach Trauma kann zu posttraumatischen infektiösen Komplikationen und zur Sepsis führen [28, 39, 45]. Eine der Strategien, um die T-Zell-Funktion wiederherzustellen, ist die Gabe von hyperosmolareren NaCl-Lösungen. Die Tonizität dieser Lösungen beträgt ungefähr das Zehnfache der Tonizität des Blutplasmas. Durch Infusion einer solchen Flüssigkeit steigt die Plasmaosmolarität und verursacht eine osmotische Verschiebung von extrazellulärer Flüssigkeit in das Gefäßsystem, wodurch das Intravasalvolumen und die Gewebepfusion nach einem Trauma schnell wiederhergestellt werden können und die zellläre Immunantwort verstärkt wird [7, 34]. Die genauen Mechanismen der Verstärkung der Immunantwort durch hyperosmolare Therapie waren jedoch lange unklar. Es konnte mittels einer neuen fluoreszenzmikroskopischen Technik gezeigt werden, dass bei T-Zellen die durch Hyperosmolarität verursachte Zellschrumpfung und dadurch bedingte Membrandeformierung zu einer Freisetzung von ATP führt, das über der Zellmembran Konzentrationen von bis zu 80 μM erreicht [18, 66]. Diese Freisetzung nach Stimulation mit 20, 40 oder 60 mM NaCl-Lösung wurde wie nach TCR-Aktivierung ebenfalls hauptsächlich durch Pannexin-1 vermittelt, wie wir durch Silencing-Experimente zeigen konnten. Die Behandlung von TCR-stimulierten T-Zellen mit hyperosmolarer NaCl-Lösung führte im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen zu einer signifikant erhöhten Phosphorylierung und damit Aktivierung der MAP-Kinase p38, sowie zu einem vierfachen Anstieg der IL-2 Transkription. Analog zu den Ergebnissen des Silencing von Pannexin-1 konnten wir beobachten, dass auch Silencing von P2X1, P2X4 und P2X7 den stimulierenden Effekt von hyperosmolarer NaCl-Lösung verminderte.

Umgekehrt konnten Agonisten dieser Rezeptoren wie ATP und das nicht-hydrolysierbare ATP-Analog ATP γ S, oder der P2X1 und P2X7 Agonist BzATP ebenso wie hyperosmolare NaCl-Lösung eine durch IL-10 induzierte T-Zell-Suppression überwinden [66]. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Verbesserung der T-Zell-Funktion durch hyperosmolare Lösungen auf ATP-Freisetzung durch Pannexin-1 und Stimulation der P2XR beruht. Als spezifische Therapie der IL-10 induzierten Immunsuppression könnte eine pharmakologische Stimulation der P2XR zu einer Verbesserung der T-Zell-Aktivität in immunsupprimierten Traumapatienten geeignet sein.

4.3.2. Expression von P2X7 auf T-Zellen bei neuropathischem Schmerz

Die Pathogenese und Therapie von neuropathischem Schmerz ist noch immer Gegenstand der Forschung. Bei durchflusszytometrischen Untersuchungen konnten wir auf T-Zellen und Monozyten von Patienten mit neuropathischem Schmerz (NeP) im Vergleich zu Patienten mit chronischen Rückenschmerzen (CLBP) und zu gesunden Probanden eine höhere Oberflächenexpression von P2X7 nachweisen [41]. Gleichzeitig waren bei diesen NeP-Patienten durch Luminex-Messungen erhöhte Serumwerte des proinflammatorischen Monozytenzytokins IL-1 β nachweisbar, für das in experimentellen Studien eine Rolle in Neurodegeneration, Entzündung und Schmerz gezeigt werden konnte [41]. Stimulation von P2X7 kann durch Aktivierung des Inflammasoms zu einer Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β führen, und die erhöhte Expression von P2X7 bei Patienten mit NeP könnte eine vermehrte Bildung von IL-1 β bedingen [20]. Diese Daten könnten ein Hinweis sein, dass eine höhere Aktivierung des purinergen Signalings durch eine erhöhte P2X7-Expression auf Leukozyten des angeborenen und adaptiven Immunsystems in der Pathogenese von chronisch neuropathischem Schmerz beteiligt ist, und könnten daher einen Ansatz zur Entwicklung künftiger Therapien darstellen.

4.3.3. Purinerges Signaling in leukämischen T-Zellen

Die akute lymphatische Leukämie (ALL) ist eine maligne Erkrankung, die ihren Ausgang von unreifen Vorstufen der Lymphozyten nimmt. Die zur Behandlung verwendeten Chemotherapeutika umfassen unter anderem Methotrexat, 6-Mercaptopurin und Fludarabin, die alle den Purinmetabolismus beeinflussen [50]. Die Expression und Funktion von Enzymen des purinergen Signaling sind bei Patienten mit ALL oft verändert. T-Lymphoblasten beispielsweise überexprimieren Adenosin-Deaminase (ADA) und zeigen im Vergleich zu gesunden T-Zellen eine Aktivitätsminderung von Purin-Nukleosid-Phosphorylase und Ecto-5'-Nucleotidase (CD73) [38, 46]. Wir konnten durch eine MitoTracker Green Färbung zeigen,

dass Leukämiezellen im Vergleich zu gesunden T-Zellen eine höhere Mitochondrienmasse besitzen. Färbungen mit Tetramethylrhodamin (TMRE) und Dihydrorhodamin-123 (DHR123) zeigten, dass diese Mitochondrien sich durch ein höheres Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) und eine erhöhte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) von gesunden T-Zellen unterscheiden. In Übereinstimmung hiermit konnte mittels HPLC gezeigt werden, dass diese im Vergleich zu gesunden T-Zellen aktiveren Mitochondrien zu höheren intra- und extrazellulären ATP-Konzentrationen führten. Mittels Fluoreszenzmikroskopie und dem fluoreszenten ATP-Farbstoff 2-2Zn(II) [35] konnte auch eine erhöhte perizelluläre ATP-Konzentration nachgewiesen werden. Eine Behandlung der T-Lymphoblasten mit Rotenon, einem Hemmstoff von Komplex I der Elektronentransportkette, oder mit Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon (CCCP), einem Inhibitor der oxydativen Phosphorylierung, verminderte die extrazelluläre ATP-Konzentration signifikant. Die Hemmung der ATP-Freisetzung durch Pannexin-1 mit dem Inhibitor CBX zeigte eine vergleichbare Verminderung der extrazellulären ATP-Konzentration, IL-2 Transkription und T-Zell-Proliferation [38].

Nach Inkubation mit dem P2 Antagonisten Suramin wurde die Mitochondrienfunktion und T-Zell-Proliferation ebenfalls signifikant supprimiert (Abb. 11). Um zu bestimmen, welche der P2 Rezeptoren maßgeblich zu der Aktivierung der Mitochondrien von T-Lymphoblasten beitragen, wurden verschiedene Antagonisten gegen die einzelnen P2R getestet.

Es zeigte sich, dass P2X1 und zu einem geringeren Maß auch P2X7 das Membranpotential und die mitochondriale ROS Produktion als Parameter der mitochondrialen Aktivität in T-

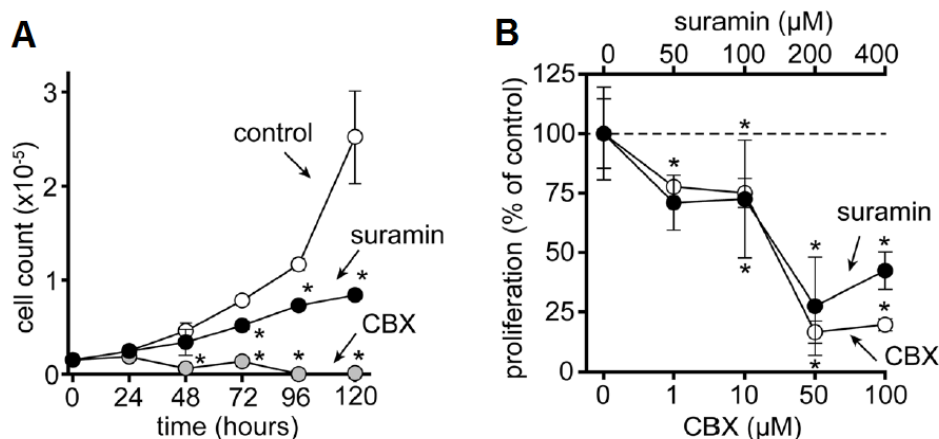


Abb. 11 Jurkat T-Zell-Wachstum benötigt ATP und Aktivierung der P2R. Jurkat T-Zellen wurden für die angegebenen Zeitintervalle mit dem unspezifischen P2XR Antagonisten Suramin (100 μM) oder dem Pannexin-1 Inhibitor CBX (100μM) inkubiert und die Zellzahl mittels eines Resazurin/Resorufin Assays bestimmt (A). Nach 72 h Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen dieser Inhibitoren wurden die Zellen mittels FACS gezählt und die Proliferationsraten bestimmt (B). Angegeben sind Mittelwerte \pm STABW, n = 4, one-way ANOVA, * p < 0,05 [38].

Lymphoblasten steuert. Nach Degradierung des extrazellulären ATP durch Zugabe von Apyrase war die Zellproliferation deutlich eingeschränkt. Dieses Prinzip konnten wir auf andere leukämische Zelllinien wie THP-1 (akute monozytische Leukämie), U-937 (histiozytisches Lymphom) und HL-60 (akute promyelozytische Leukämie) übertragen [38].

Ein überschießendes aktiverendes purinerges Signaling trägt somit zu einer dauerhaften Aktivierung und unkontrollierten Proliferation von Leukämiezellen bei. Eine pharmakologische Hemmung dieser dysregulierten Signalkaskade verminderte die Mitochondrienaktivität und Proliferation von Leukämiezellen, was die Komponenten des purinergen Signalings zu einem vielversprechenden Ziel neuer Therapieansätze bei Leukämien machen könnte.

5. Zusammenfassung

Anhand der hier zusammengefassten Studien wurden die eingangs formulierten Fragestellungen beantwortet und der Mechanismus und die hohe Relevanz des purinergen Signalings für eine effektive T-Zell-Aktivierung charakterisiert. Die aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass nach Stimulation des TCR über Pannexin-1 kontrolliert ATP in den Extrazellulärraum freigesetzt wird. Zusätzlich wird ATP durch Ectonukleotidasen zu ADP dephosphoryliert. ATP und ADP aktivieren P2X1, P2X4, P2X7 sowie P2Y1 und P2Y12 und sorgen für die Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und die Stimulation aktivierender Signalwege. Gleichzeitig werden P2X1, P2X4 und P2Y1 ebenso wie der Freisetzungskanal ihrer Liganden, Pannexin-1, zu der sich ausbildenden Immunsynapse umverteilt. Hauptsächlich durch P2X4 und P2Y1 wird die Mitochondrienaktivität und damit die ATP-Produktion und -Freisetzung erhöht und unterhält so die Signalamplifikation. In der Folge werden weitere Wege der Zellaktivierung über NFAT und cAMP vermittelt und die Expression von IL-2 und die T-Zell-Proliferation angeregt (Abb. 12).

Klinisch können diese Erkenntnisse genutzt werden, um die Pathophysiologie der T-Zellen therapeutisch zu modifizieren. Durch Verabreichung von hyperosmolaren NaCl-Lösungen kann eine Schrumpfung und damit mechanische Deformierung der T-Zelle ausgelöst und dadurch die ATP-Freisetzung über Pannexin-1 weiter gesteigert werden. Aufgrund der so erhöhten extrazellulären ATP-Konzentrationen ist es möglich, auch eine IL-10-induzierte Suppression der T-Zelle zu überwinden. Spezifischer können pharmakologische Agonisten von P2X1, P2X4 und P2X7 verwendet werden, um einer T-Zell-Suppression entgegenzuwirken.

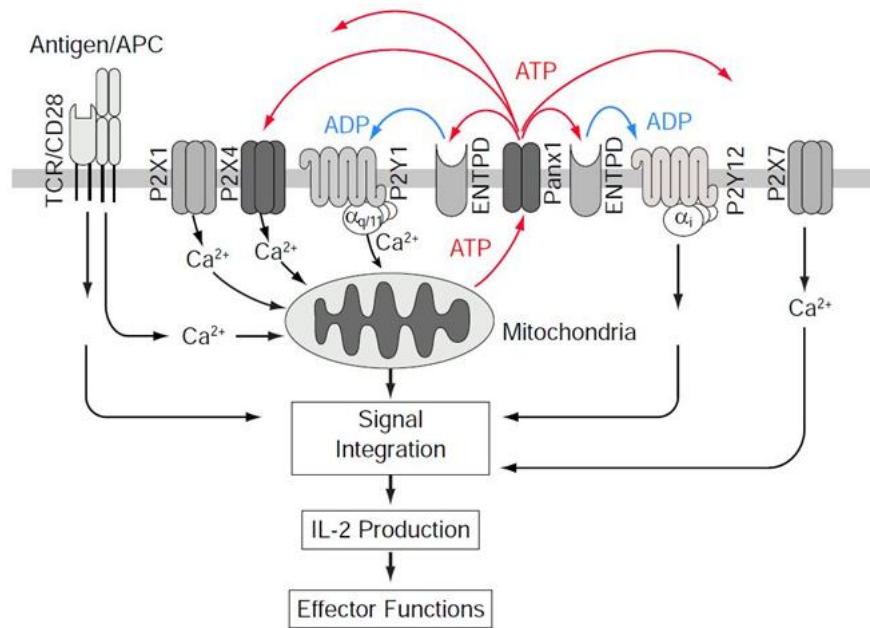


Abb. 12 Schematische Darstellung der purinergen T-Zell-Aktivierung. Erstellt aus [38, 64, 65, 66, 69].

Die aktivierende Wirkung des purinergen Signalings kann jedoch bei dauerhafter Aktivierung auch zu einer unkontrollierten Proliferation beitragen, wie es bei Leukämiezellen gezeigt werden konnte. Durch pharmakologische Inhibitoren der P2R konnten die dysregulierten Signalkaskaden gehemmt, die Mitochondrienaktivität gebremst und somit das Wachstum der Leukämiezellen vermindert werden. Patienten mit neuropathischem Schmerz zeigten im Vergleich zu Gesunden und Patienten mit chronischen Rückenschmerzen ebenfalls eine stärkere Aktivierung des purinergen Systems über die höhere Expression von P2X7 auf T-Zellen und Monozyten. Eine ebenfalls erhöhte Expression des proinflammatorischen IL-1 β bei dieser Patientengruppe könnte an der Entstehung des neuropathischen Schmerzes beteiligt sein. Bei diesen Erkrankungen stellt die purinerge T-Zell-Aktivierung ein mögliches Ziel neuer Therapieansätze dar.

Mit Clopidogrel ist bereits ein Inhibitor für P2Y12 für den klinischen Einsatz am Patienten verfügbar. Aktuell sind weitere Inhibitoren der purinergen Rezeptoren und Ektonukleotidasen in klinischer Erprobung. Hierdurch eröffnet sich für die Zukunft ein interessantes klinisches Forschungsfeld der medikamentösen purinergen Immunmodulation.

6. Literatur

1. Angus DC (2011) The search for effective therapy for sepsis: back to the drawing board? *JAMA* 306:2614-2615
2. Aswad F, Dennert G (2006) P2X7 receptor expression levels determine lethal effects of a purine based danger signal in T lymphocytes. *Cell Immunol* 243:58-65
3. Ballerini P, Dovizio M, Bruno A, Tacconelli S, Patrignani P (2018) P2Y12 Receptors in Tumorigenesis and Metastasis. *Front Pharmacol* 9:66
4. Bao L, Locovei S, Dahl G (2004) Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. *FEBS Lett* 572:65-68
5. Bo X, Jiang LH, Wilson HL, Kim M, Burnstock G, Surprenant A, North RA (2003) Pharmacological and biophysical properties of the human P2X5 receptor. *Mol Pharmacol* 63:1407-1416
6. Boomer JS, To K, Chang KC, Takasu O, Osborne DF, Walton AH, Bricker TL, Jarman SD, 2nd et al. (2011) Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA* 306:2594-2605
7. Brod VI, Krausz MM, Hirsh M, Adir Y, Bitterman H (2006) Hemodynamic effects of combined treatment with oxygen and hypertonic saline in hemorrhagic shock. *Crit Care Med* 34:2784-2791
8. Bruzzone R, Barbe MT, Jakob NJ, Monyer H (2005) Pharmacological properties of homomeric and heteromeric pannexin hemichannels expressed in *Xenopus* oocytes. *J Neurochem* 92:1033-1043
9. Bruzzone R, Hormuzdi SG, Barbe MT, Herb A, Monyer H (2003) Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13644-13649
10. Burnstock G (1972) Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 24:509-581
11. Burnstock G, Fredholm BB, North RA, Verkhratsky A (2010) The birth and postnatal development of purinergic signalling. *Acta Physiol (Oxf)* 199:93-147
12. Carson WFT, Cavassani KA, Ito T, Schaller M, Ishii M, Dou Y, Kunkel SL (2010) Impaired CD4+ T-cell proliferation and effector function correlates with repressive histone methylation events in a mouse model of severe sepsis. *Eur J Immunol* 40:998-1010
13. Chakraborty S, Karasu E, Huber-Lang M (2018) Complement After Trauma: Suturing Innate and Adaptive Immunity. *Front Immunol* 9:2050
14. Chen L, Flies DB (2013) Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* 13:227-242
15. Chen Y, Bao Y, Zhang J, **Woehrle T**, Sumi Y, Ledderose S, Li X, Ledderose C et al. (2015) Inhibition of Neutrophils by Hypertonic Saline Involves Pannexin-1, CD39, CD73, and Other Ectonucleotidases. *Shock* 44:221-227
16. Chen Y, Corriden R, Inoue Y, Yip L, Hashiguchi N, Zinkernagel A, Nizet V, Insel PA et al. (2006) ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science* 314:1792-1795
17. Chen Y, Yao Y, Sumi Y, Li A, To UK, Elkhail A, Inoue Y, **Woehrle T** et al. (2010) Purinergic signaling: a fundamental mechanism in neutrophil activation. *Sci Signal* 3:ra45
18. Corriden R, Insel PA, Junger WG (2007) A novel method using fluorescence microscopy for real-time assessment of ATP release from individual cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 293:C1420-1425
19. Crispin JC, Tsokos GC (2009) Transcriptional regulation of IL-2 in health and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 8:190-195

20. De Marchi E, Orioli E, Dal Ben D, Adinolfi E (2016) P2X7 Receptor as a Therapeutic Target. *Adv Protein Chem Struct Biol* 104:39-79
21. Di Virgilio F, Sarti AC, Coutinho-Silva R (2020) Purinergic signaling, DAMPs, and inflammation. *Am J Physiol Cell Physiol* 318:C832-C835
22. Giuliani AL, Sarti AC, Di Virgilio F (2019) Extracellular nucleotides and nucleosides as signalling molecules. *Immunol Lett* 205:16-24
23. Gwack Y, Feske S, Srikanth S, Hogan PG, Rao A (2007) Signalling to transcription: store-operated Ca²⁺ entry and NFAT activation in lymphocytes. *Cell Calcium* 42:145-156
24. Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A (2003) Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev* 17:2205-2232
25. Hotchkiss RS, Coopersmith CM, Mcdunn JE, Ferguson TA (2009) The sepsis seesaw: tilting toward immunosuppression. *Nat Med* 15:496-497
26. Hotchkiss RS, Karl IE (2003) The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 348:138-150
27. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D (2013) Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis* 13:260-268
28. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D (2013) Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 13:862-874
29. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Schmieg RE, Jr., Hui JJ, Chang KC, Osborne DF, Freeman BD et al. (2001) Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4⁺ T lymphocytes in humans. *J Immunol* 166:6952-6963
30. Ikeda M (2007) Characterization of functional P2X(1) receptors in mouse megakaryocytes. *Thromb Res* 119:343-353
31. Imanishi T, Saito T (2020) T Cell Co-stimulation and Functional Modulation by Innate Signals. *Trends Immunol* 41:200-212
32. Jarvis MF, Khakh BS (2009) ATP-gated P2X cation-channels. *Neuropharmacology* 56:208-215
33. Junger WG (2011) Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat Rev Immunol* 11:201-212
34. Junger WG, Liu FC, Loomis WH, Hoyt DB (1994) Hypertonic saline enhances cellular immune function. *Circ Shock* 42:190-196
35. Kurishita Y, Kohira T, Ojida A, Hamachi I (2012) Organelle-localizable fluorescent chemosensors for site-specific multicolor imaging of nucleoside polyphosphate dynamics in living cells. *J Am Chem Soc* 134:18779-18789
36. Ledderose C, Bao Y, Lidicky M, Zipperle J, Li L, Strasser K, Shapiro NI, Junger WG (2014) Mitochondria are gate-keepers of T cell function by producing the ATP that drives purinergic signaling. *J Biol Chem* 289:25936-25945
37. Ledderose C, Bao Y, Zhang J, Junger WG (2015) Novel method for real-time monitoring of ATP release reveals multiple phases of autocrine purinergic signalling during immune cell activation. *Acta Physiol (Oxf)* 213:334-345
38. Ledderose C, **Woehrle T**, Ledderose S, Strasser K, Seist R, Bao Y, Zhang J, Junger WG (2016) Cutting off the power: inhibition of leukemia cell growth by pausing basal ATP release and P2X receptor signaling? *Purinergic Signal* 12:439-451
39. Lederer JA, Rodrick ML, Mannick JA (1999) The effects of injury on the adaptive immune response. *Shock* 11:153-159
40. Locovei S, Wang J, Dahl G (2006) Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. *FEBS Lett* 580:239-244

41. Luchting B, Heyn J, **Woehrle T**, Rachinger-Adam B, Kreth S, Hinske LC, Azad SC (2016) Differential expression of P2X7 receptor and IL-1beta in nociceptive and neuropathic pain. *J Neuroinflammation* 13:100
42. Ma W, Hui H, Pelegrin P, Surprenant A (2009) Pharmacological characterization of pannexin-1 currents expressed in mammalian cells. *J Pharmacol Exp Ther* 328:409-418
43. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M (2003) The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 348:1546-1554
44. North RA (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 82:1013-1067
45. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL (2001) Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity. *Shock* 16:83-96
46. Poplack DG, Blatt J, Reaman G (1981) Purine pathway enzyme abnormalities in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 41:4821-4823
47. Praetorius HA, Leipziger J (2009) ATP release from non-excitabile cells. *Purinergic Signal* 5:433-446
48. Quintana A, Schwindling C, Wenning AS, Becherer U, Rettig J, Schwarz EC, Hoth M (2007) T cell activation requires mitochondrial translocation to the immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:14418-14423
49. Ralevic V, Burnstock G (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50:413-492
50. Riscoe MK, Brouns MC, Fitchen JH (1989) Purine metabolism as a target for leukemia chemotherapy. *Blood Rev* 3:162-173
51. Roessner PM, Seiffert M (2020) T-cells in chronic lymphocytic leukemia: Guardians or drivers of disease? *Leukemia*
52. Schenk U, Westendorf AM, Radaelli E, Casati A, Ferro M, Fumagalli M, Verderio C, Buer J et al. (2008) Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels. *Sci Signal* 1:ra6
53. Sim JA, Broomhead HE, North RA (2008) Ectodomain lysines and suramin block of P2X1 receptors. *J Biol Chem* 283:29841-29846
54. Soulet C, Sauzeau V, Plantavid M, Herbert JM, Pacaud P, Payrastre B, Savi P (2004) Gi-dependent and -independent mechanisms downstream of the P2Y12 ADP-receptor. *J Thromb Haemost* 2:135-146
55. Thompson RJ, Zhou N, Macvicar BA (2006) Ischemia opens neuronal gap junction hemichannels. *Science* 312:924-927
56. Torres GE, Egan TM, Voigt MM (1999) Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. *J Biol Chem* 274:6653-6659
57. Valitutti S, Muller S, Cella M, Padovan E, Lanzavecchia A (1995) Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature* 375:148-151
58. Van Der Merwe PA (2001) The TCR triggering puzzle. *Immunity* 14:665-668
59. Van Dissel JT, Van Langevelde P, Westendorp RG, Kwappenberg K, Frolich M (1998) Anti-inflammatory cytokine profile and mortality in febrile patients. *Lancet* 351:950-953
60. Viola A, Contento RL, Molon B (2010) Signaling amplification at the immunological synapse. *Curr Top Microbiol Immunol* 340:109-122
61. Von Kugelgen I, Harden TK (2011) Molecular pharmacology, physiology, and structure of the P2Y receptors. *Adv Pharmacol* 61:373-415
62. Wenzel RP, Edmond MB (2012) Septic shock--evaluating another failed treatment. *N Engl J Med* 366:2122-2124
63. Wherry EJ, Kurachi M (2015) Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol* 15:486-499

64. **Woehrle T**, Ledderose C, Rink J, Slubowski C, Junger WG (2019) Autocrine stimulation of P2Y1 receptors is part of the purinergic signaling mechanism that regulates T cell activation. *Purinergic Signal* 15:127-137
65. **Woehrle T**, Yip L, Elkhail A, Sumi Y, Chen Y, Yao Y, Insel PA, Junger WG (2010) Pannexin-1 hemichannel-mediated ATP release together with P2X1 and P2X4 receptors regulate T-cell activation at the immune synapse. *Blood* 116:3475-3484
66. **Woehrle T**, Yip L, Manohar M, Sumi Y, Yao Y, Chen Y, Junger WG (2010) Hypertonic stress regulates T cell function via pannexin-1 hemichannels and P2X receptors. *J Leukoc Biol* 88:1181-1189
67. Yang R, Liang BT (2012) Cardiac P2X(4) receptors: targets in ischemia and heart failure? *Circ Res* 111:397-401
68. Yip L, Cheung CW, Corriden R, Chen Y, Insel PA, Junger WG (2007) Hypertonic stress regulates T-cell function by the opposing actions of extracellular adenosine triphosphate and adenosine. *Shock* 27:242-250
69. Yip L, **Woehrle T**, Corriden R, Hirsh M, Chen Y, Inoue Y, Ferrari V, Insel PA et al. (2009) Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X7 receptors. *FASEB J* 23:1685-1693
70. Zigmond SH (1977) Ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotactic factors. *J Cell Biol* 75:606-616
71. Zimmermann H (2000) Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 362:299-309

7. Publikationen der kumulativen Habilitationsschrift

Woehrle T, Ledderose C, Rink J, Slubowski C, Junger WG.

Autocrine stimulation of P2Y1 receptors is part of the purinergic signaling mechanism that regulates T cell activation.

Purinergic Signal. 2019, 15:127-137. (Impact Factor: 3,065)

Luchting B*, Heyn J*, **Woehrle T***, Rachinger-Adam B, Kreth S, Hinske LC, Azad SC.

Differential expression of P2X7 receptor and IL-1 β in nociceptive and neuropathic pain.

J Neuroinflammation. 2016,13:100. (Impact Factor: 5,102)

***equal contribution**

Woehrle T, Yip L, Elkhail A, Sumi Y, Chen Y, Yao Y, Insel PA, Junger WG.

Pannexin-1 hemichannel-mediated ATP release together with P2X1 and P2X4 receptors regulate T-cell activation at the immune synapse.

Blood. 2010, 116:3475-84. (Impact Factor: 10,558)

Woehrle T, Yip L, Manohar M, Sumi Y, Yao Y, Chen Y, Junger WG.

Hypertonic stress regulates T cell function via pannexin-1 hemichannels and P2X receptors.

J Leukoc Biol. 2010. 88:1181-9. (Impact Factor: 4,626)

Ledderose C, **Woehrle T**, Ledderose S, Strasser K, Seist R, Bao Y, Zhang J, Junger WG.

Cutting off the power: inhibition of leukemia cell growth by pausing basal ATP release and P2X receptor signaling?

Purinergic Signal. 2016, 3:439-51. (Impact Factor: 3,022)

Chen Y, Bao Y, Zhang J, **Woehrle T**, Sumi Y, Ledderose S, Li X, Ledderose C, Junger WG.

Inhibition of Neutrophils by Hypertonic Saline Involves Pannexin-1, CD39, CD73, and Other Ectonucleotidases.

Shock 2015, 44:221-227. (Impact Factor: 3,048)

Chen Y, Yao Y, Sumi Y, Li A, To UK, Elkhail A, Inoue Y, **Woehrle T**, Zhang Q, Hauser C, Junger WG.

Purinergic signaling, a fundamental mechanism in neutrophil activation.

Sci Signal. 2010, 3:ra45. (Impact Factor: 6,354)

Yip L, **Woehrle T**, Corriden R, Hirsh M, Chen Y, Inoue Y, Ferrari V, Insel PA, Junger WG.

Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X7 receptors.

FASEB J. 2009, 23:1685-93. (Impact Factor: 6,401)